



TITLE:

自由:11 血管内皮細胞にあるSAチャネルの性質の解明(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

長谷川, 昇

CITATION:

長谷川, 昇. 自由:11 血管内皮細胞にあるSAチャネルの性質の解明(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1994, 24: 78-79

ISSUE DATE:

1994-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164553>

RIGHT:

数を占めること、また、比較的単純な条件で活動するものから、幾つかの条件が満たされた時にのみ活動するものまで、様々なレベルのニューロンの存在が明らかになった。前頭連合野のニューロン応答の多様性は、前頭連合野にアクセスする皮質・皮質下領域に、そこが必要とするどのような情報をも提供できる可能性を示唆していると思われる。

自由：10

霊長類椎間板髄核に対するコンドロイチナーゼABCの影響（長期経過）

岩田 久（名古屋大学・整形外科）
加藤文彦、安藤智洋、杉村恒人
（半田病院・整形外科）

近年、腰椎椎間板ヘルニアの治療法として化学的椎間板溶解術（chemonucleolysis）が注目され、欧米ではその薬剤としてキモパインが使用され、本邦でも認可予定である。しかしながらキモパインは軟骨以外の組織も傷害し、軟骨細胞傷害も強いことが知られている。コンドロイチナーゼABCは軟骨基質内のグリコサミノグリカンにのみ基質特異性を有するため、軟骨以外の組織を傷害しないこと、細胞傷害性も低いことがウサギを用いて確かめられている。コンドロイチナーゼABCの臨床応用を進めるためには、ヒトに近い霊長類の椎間板を用いた実験は不可欠であると考え、平成4年度にはアカゲザルの腰椎椎間板にキモパイン、生食水を対照として、コンドロイチナーゼABCを注射し、1、6週後に実験殺し検討した。検討項目は単純X線、光顕組織、生化学、MRIである。結果として霊長類の椎間板に対してもコンドロイチナーゼABCはchemonucleolysis効果を有することが判明した。

平成5年度は4年度と同じ手技にてコンドロイチナーゼABCのみを椎間板内注入する実験を行い、6ヶ月後に実験殺し、同様の分析を行った。結果として軟骨基質、特にコンドロイチン硫酸が回復することが確かめられた。またコンドロイチナーゼABCの神経への安全性を確認するために、クモ膜下腔に注入し、6ヶ月後に実験殺し、組織学的検討を行った。結果として霊長類でもコンドロイチナーゼABCは神経組織に組織学的に影響のないことが判明した。

またコンドロイチナーゼABCは土壌細菌である *Proteus vulgaris* から抽出される酵素であり、サルにとっては異種蛋白である。そこでこれらの実験の折りに、コンドロイチナーゼABCに対する血清IgG+IgM、IgE量を経時的に測定した。結果としてIgEは有意の変化を示さないが、IgG+IgMは2週以後上昇した。

アカゲザル椎間板、およびクモ膜下腔にコンドロイチナーゼABCを注入し、コンドロイチナーゼABCが基質選択的な化学的椎間板溶解術（chemonucleolysis）を安全に行いうることを確かめた。

自由：11

血管内皮細胞にあるSAチャネルの性質の解明

長谷川 昇（名古屋文理短大）

本研究は、サルにおける血管内皮細胞のSAチャネルが圧受容にどのような役割を果たしているのかを明らかにするために行われた。この課題は前年度からの継続の内容であり、本年度は、内皮細胞を前年度に決定した条件を用いて培養し、パッチクランプ法を行った結果、チャネルの性状をある程度明らかにすることができた。

方 法

血管内皮細胞の培養

胸部大動脈の両端をクランプし、できるだけ無菌的に摘出し、冷却した。血管内の血液を洗浄後、血管軸方向に切開し、メス刃により剥離した後、ディッシュにまき培養した。培養液は、ヒト血管内皮細胞用（ET-UV、三光純薬）を用い、2日おきに交換した。

SAチャネルのスクリーニング

培養細胞をフィブロネクチンでコートしたカバーガラス上に培養し、通常のパッチクランプ法を用いて、チャネル活性の変化を記録した。結果はPC-ATに取り込んで解析した。

結 果

①圧依存性について

ギガシール形成後、ピペット内圧を陰圧にしていくと、それに伴って開確率が上昇するチャネルが見られた。コンダクタンスは、約50pSであった。

②電位依存性について

ピペット電位を変え、電位変化による開確率の

変化を検討した結果、開確率は膜電位にあまり依存しないことがわかった。

③イオン選択性について

インサイドアウトパッチで、細胞内を細胞外と異なるイオン組成の液で灌流した結果、ナトリウム、カリウムなどの1価のカチオンに対する選択性は弱いことがわかった。

考 察

今後、SAチャネルの阻害剤を細胞外液に加え、チャネルの活性化が抑制されるか否かを確認し、骨格筋などに見られるSAチャネルと同様な性質のものかどうかを検討していく。

自由：13

PCR-SSO法による霊長類MHC-DQ α 遺伝子型の検出法の確立

打樋利英子・小島俊典・水野 靖・勝又義直
(名古屋大・医・法医)

霊長類の主要組織適合抗原であるMHC遺伝子は、ヒトHLA遺伝子と同様に多型性を有することが知られているので、MHC各遺伝子型の簡便な検出法が確立されれば、個体識別への応用が容易となる。また、スギ花粉症などのアレルギー疾患に関する研究に際し、各個体のMHC遺伝子型の検出は不可欠である。霊長類MHC遺伝子はヒトHLA遺伝子とホモロジーが高いので、ヒトHLA-DQA1遺伝子用のプライマーを用いたPCR法により、原猿類以外のすべての霊長類において増幅されることをすでに確認している。こうして得られた各増幅産物について、ヒトDQA1遺伝子型を検出するためのSSO (sequence specific oligonucleotide) プローブを用いてドット・プロット・ハイブリダイゼーションを行い、その結果をヒトDQA1遺伝子の塩基配列と比較した。N末側の40アミノ酸残基あたりまでは全般的によく保存されていて、ヒトDQA1遺伝子ともホモロジーが高い。50残基あたりよりC末側は、ヒトDQA1遺伝子と同様に変異に富むが、一部のヒトDQA1遺伝子用SSOプローブに対して反応するのみであった。各霊長類のDQA1 (DQ α) 遺伝子の塩基配列をみると、51から57アミノ酸残基付近の塩基配列はヒトDQA1の各対立遺伝子とは異なる配列である場合が多かった。従って、この領域の各配列を検出するためのプロ-

ブを新たに作製する必要があることがわかった。以上のことから、一部のヒトDQA1遺伝子用のSSOプローブを利用しながら、さらに霊長類専用のSSOプローブを作製すれば、PCR-SSO法による霊長類DQ α 遺伝子型の検出は十分可能と考えられ、個体識別への応用が期待できる。

自由：15

ヤクシマザルの種子散布 - 距離、方向、種子の運命

湯本貴和・小野公嗣 (神戸大・理)
野間直彦 (京都大・生態研センター)

屋久島に生息するヤクシマザルは、果実を飲み込み糞に排泄することによって種子散布をおこなうとともに、頬袋に果実を詰め込み種子だけを吐き出すことによって種子散布を行っている。本研究では頬袋によるタブノキの種子散布について、種子が運ばれる距離、吐き出された場所の状況、吐き出された種子の発芽率を調査した。

1993年7月12日から23日までヤクシマザルの追跡調査を行った。タブノキの種子は採食したタブノキから0mで39%、30m以内で80% (N=349) と、圧倒的に近くに吐き出されて散布されたが、中には100mも運ばれたものもあった。これは採食から休憩までの移動距離と関わりがある。

散布される場所は陽の当たる所が多く、散布距離0mを除く74% (N=220) が陽なたに散布された。ヤクシマザルは陽の当たる場所でよく休憩するためであり、結果として種子の発芽や実生の生長に有利だと考えられる。

発芽率は吐き出された種子が82.5%、自然落下したものが12.5%と、吐き出された種子の方が圧倒的に高い。

以上のことから、タブノキにとってヤクシマザルが種子散布の大きな役割を担っていることがわかる。冬季に実る同じクスノキ科のシロダモについても同様の結果が得られており、頬袋による種子散布が屋久島の照葉樹林で、樹木の繁殖に果たす役割が大きいことが窺える。

自由：16

尿中ホルモンによる霊長類の生殖機能の解析
渡辺 元 (東京農工大学農学部・家畜生理)